

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



**Koordinální vlastnosti ethylfosfonového derivátu
TACN**

Coordination properties of TACN ethylphosphonic derivate

Diplomová práce

Zpracovala: Bc. Zuzana Poláková

Školitel: doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

Květen 2016

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného akademického titulu. Verze odevzdané v tištěné a v elektronické podobě jsou totožné.

V Praze dne 12. 5. 2016

Zuzana Poláková

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Vojtěchu Kubíčkovi, Ph.D. za velikou pomoc a rady při psaní a konání diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Zuzce za pomoc u potenciometrických měření, Terce a Honzovi u měření NMR a všem, co mi v laborce pomáhali.

Na závěr bych ráda poděkovala rodině, přátelům a všem známým, co mi drželi palce a všemožně mě podporovali při studiu.

SOUHRN

Byla provedena syntéza monoesteru fosfonátového derivátu triazacyklononanu NOTP^{OE_t}. Následně byly stanoveny jeho protonizační konstanty pomocí potenciometrických titrací. Stanoveny byly také konstanty stability komplexů ligandu NOTP^{OE_t} s ionty kovů: Cu(II), Zn(II), Ni(II) a Ga(III). Komplexace Ga(III) a Cu(II) iontů byla sledována pomocí NMR a UV-VIS spektroskopie.

Práce byla zaměřena na popis a charakteristiku esterifikovaného ligandu NOTP^{OE_t} a na jeho možnost využití v biomedicínských aplikacích.

Klíčová slova

Komplexy, makrocyclické ligandy, termodynamická stabilita, potenciometrie

Abstract

Ligand NOTP^{OE_t} was synthesized. Protonation constants and stability constants of Cu(II), Zn(II), Ni(II) and Ga(III) complexes were determined by potentiometric titrations. Cu(II) complex was characterized by UV-VIS spectroscopy and formation of Ga(III) complex was studied by NMR spectroscopy.

The work was aimed at characterisation of the ligand with respect to potential application in biomedical imaging techniques.

Keywords

Complexes, macrocyclic ligands, thermodynamic stability, potentiometry

Seznam zkratek

M	kov všeobecně
L	ligand
[M]	rovnovážná koncentrace kovu
[L]	rovnovážná koncentrace deprotonovaného ligandu
[ML]	rovnovážná koncentrace komplexu
K_{ML}	konsekutivní konstanta stability
β	celková konstanta stability
MRI	tomografie magnetické rezonance
PET	pozitronová emisní tomografie
SPECT	jednofotonová počítačová emisní tomografie
TACN	triazacyklononan
NOTA	1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina
NOTP ^{OE_t}	monoester fosfonátového derivátu ligandu NOTA
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelná oblast

Obsah

1	Teoretický úvod	8
1.1	Molekulární zobrazení.....	8
1.1.1	PET.....	9
1.2	Ligand NOTA a jeho deriváty.....	12
1.3	Termodynamická stabilita komplexů a rychlost komplexace	15
1.4	Cíl práce.....	16
2	Experimentální část	17
2.1	Použité chemikálie	17
2.2	Použité přístroje	17
2.3	Syntéza $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$	18
2.4	Potenciometrická měření.....	18
2.5	UV- VIS spektroskopie	19
2.6	NMR spektroskopie	19
3	Výsledky a diskuze	21
3.1	Syntéza ligandu $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$	21
3.2	Acidobazické vlastnosti	22
3.3	Koordinační vlastnosti.....	24
3.4	UV-VIS spektroskopie Cu^{2+} komplexu	29
3.5	Formace Ga^{3+} komplexu	31
4	Závěr	37
5	Literatura	38

1 Teoretický úvod

Komplexy makrocyclických ligandů jsou známy především vysokou termodynamickou stabilitou, kinetickou inertností a dalšími důležitými vlastnostmi. Jednou z důležitých vlastností makrocyclických ligandů je selektivita ligandu k iontu kovu. To umožňuje široké uplatnění v řadě oborů, zejména v radiodiagnostice a protirakovinné radioterapii.

1.1 Molekulární zobrazení

Lékařská diagnostika a výzkum stále více směřují k získání informací o biochemickém stavu až na molekulární úroveň. Moderní diagnostika je neinvazivní a je založena na fyzikálně-chemických procesech.⁽¹⁾ Jednou z používaných metod je zobrazování magnetickou rezonancí (MR, v zahraničí také známou pod MRI z anglického magnetic resonance imaging).⁽²⁾ MRI je založeno na změně chování jader atomů vodíku ^1H (přítomných v molekule vody), které jsou umístěny v silném magnetickém poli. Radiofrekvenční záření pole excituje jádra atomu vodíku. Díky relaxačním procesům se vracejí do původního stavu a uvolňují absorbovanou energii ve formě elektromagnetického záření. To je poté detekováno.⁽¹⁾

Další metody jsou založeny na radioaktivním záření - jednofotonová emisní počítačová tomografie (single-photon emission computed tomography, SPECT)^(3,4) a pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography, PET).⁽⁵⁾ Obě získávají prostorové informace díky lokalizaci radioaktivních izotopů v tkáních. Záření je zachyceno detektory umístěnými okolo těla pacienta, obdobně jako u rentgenového záření, tj. počítačové tomografie (computed tomography, CT).^(1,4)

Metoda SPECT detekuje γ -záření emitované přímo radioizotopem. Je schopna detekce záření o různých energiích emitovaných různými izotopy. Tím je možná zpětná rekonstrukce distribuce izotopu v těle a možnost získání trojrozměrných či tomografických snímků.⁽⁶⁾ Metoda využívá nejčastěji izotopy ^{201}Tl ⁽⁷⁾, ^{111}In , ^{123}I ⁽¹⁾ a $^{99\text{m}}\text{Tc}$.⁽⁸⁾

1.1.1 PET

Pozitronová emisní tomografie získává prostorové informace díky lokalizaci různého množství radioaktivních izotopů v tkáních. Umožňuje detekci a monitorování odlišných druhů biologických a patologických procesů po označení buněk radiofarmaky.

PET detekuje dva kolineární fotony, které vznikají anihilací pozitronu emitovaného radioizotopem. V nedávných letech došlo ke snížení cen tomografů pro PET metodu, a proto se stává první volbou v nukleární medicíně pro detekci nádorů a poškození tkání. Tato metoda má velmi vysokou citlivost, je schopná zaznamenat až pikomolární koncentrace izotopu (10^{-12} M). Má také velice dobré prostorové rozlišení (v klinickém uspořádání až 1 mm^3). Z tohoto důvodu se může použít i ke zviditelnění velmi malých metastáz.⁽⁹⁾

Také u této metody se používají kontrastní látky (contrast agents, CA). V případě PET metody jsou nezbytné, neboť přítomné radioizotopy jsou zdrojem radioaktivního záření. Použití pozitronové emisní tomografie je závislé na radionuklidech.⁽¹⁰⁾ Z nekovových izotopů je nejdůležitější ^{18}F vyráběný v cyklotronech.⁽¹¹⁾

Zástupcem kovových radionuklidů je ^{64}Cu vzniklý v reaktoru reakcí $^{64}\text{Zn}(n, p)^{64}\text{Cu}$ nebo v cyklotronech reakcí $^{64}\text{Ni}(p, n)^{64}\text{Cu}$. Radionuklid je vhodný pro svůj poločas rozpadu, 12,7 hodin⁽¹²⁾. Ten umožňuje dobrou manipulaci.⁽¹³⁾

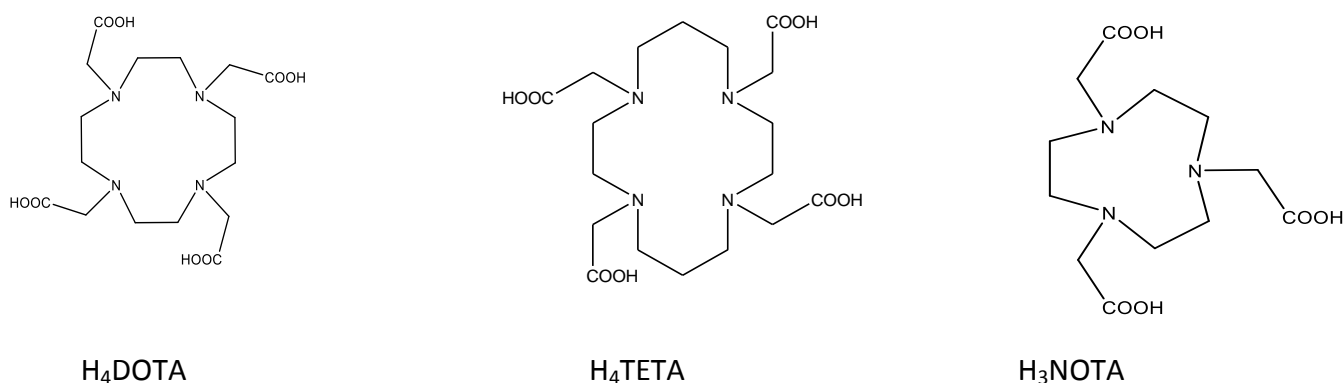
V poslední řadě stoupá zájem o izotopy galia. Tři radionuklidy galia jsou vhodné pro použití v radiofarmacii. Izotop ^{67}Ga se využívá u metody SPECT a u gama scintigrafie. Jeho poločas rozpadu je 78,3 hodiny. Je vyráběn v cyklotronu bombardováním zinku nebo mědi protonem ($^{67}\text{Zn}(p, n)^{67}\text{Ga}$), deuteronem ($^{67}\text{Zn}(d, 2n)^{67}\text{Ga}$) nebo α částicí ($^{64}\text{Zn}(^4\text{He}, p)^{67}\text{Ga}$) nebo ($^{65}\text{Cu}(^4\text{He}, 2n)^{67}\text{Ga}$). Izotopy ^{66}Ga a ^{68}Ga se využívají při vývoji PET radiofarmak. ^{66}Ga má poločas rozpadu 9,49 hodin.⁽⁴⁾ Izotop ^{66}Ga je vyráběn v malém biomedicínském cyklotronu reakcí $^{66}\text{Zn}(p, n)^{66}\text{Ga}$. Jeho delší poločas umožňuje získání dat i v pozdějším čase na rozdíl od izotopu ^{68}Ga .⁽⁶⁾ Nyní se vědci soustřeďují na izotop ^{68}Ga ^(14,15,16), který s poločasem 67,71

minuty je důležitým radionuklidem emitující pozitron.⁽⁶⁾ Může být produkován kompaktním generátorem elektronovým zachytem rozpadu ^{68}Ge ($\tau_{1/2}=270,95$ dní).⁽¹⁷⁾

Ve vodném roztoku je galium přítomno ve formě kationtu. Galité ionty nemohou být na vybranou molekuly navázány přímo (kovalentně) jako je tomu u nekovových izotopů pro PET metodu. Pro aplikaci je nutno kov navázat vhodným ligandem, se kterým vytvoří stabilní komplex, neboť kov je pro organismus toxický. Ukládá se v různých tkáních, zejména v kostech. Galité ionty by s ligandem měly tvořit stabilní komplex už v kyselé oblasti. Při pH větším než 4 se vytvoří nerozpustný hydroxid galitý, který se u pH 8 rozpustí a vznikne hydroxokomplex.⁽¹⁾

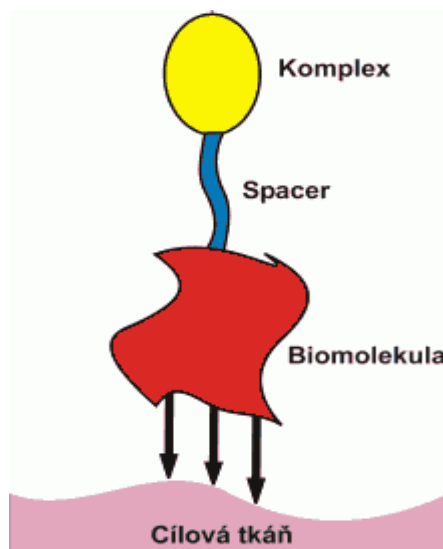
Kromě obecných požadavků, mezi které spadá snadná a levná syntéza, dlouhodobá stálost, by měl ideální ligand pro izotop ^{68}Ga mít další vlastnosti.⁽¹⁸⁾ Výsledný komplex by měl být termodynamicky i kineticky stabilní. Další vlastností je rychlá komplexace, která by měla probíhat v řádu minut a nejlépe při teplotě nižší než 40° C, pH menším než 4 a při velmi nízkých koncentracích (nanomolárních až pikomolárních). Ligand musí být ke galitým iontům selektivní. Selektivita je důležitá zejména kvůli možné transmetalaci s biogenními ionty; Ca^{2+} , Mg^{2+} a Zn^{2+} .⁽¹⁹⁾

Nejčastěji používané ligandy jsou makrocyclické deriváty H_4DOTA ⁽²⁰⁾, H_3NOTA ⁽²¹⁾ a H_4TETA ⁽²²⁾ (obr. 1. 1). Tvoří komplexy s vysokou termodynamickou stabilitou a kinetickou stálostí.



Obr. 1. 1: Makrocyclické ligandy H_4DOTA , H_4TETA a H_3NOTA

Poslední vlastností je schopnost konjugace s biologicky aktivními molekulami. Ty zajistí specifickou distribuci léčiva (tzv. biotargeting). Targeting, specifická vazba na cílovou tkáň, umožňuje výrazné snížení aplikování dávky farmaka, tj. kontrastní látky nebo účinné látky. Dochází k tomu za současného udržení či dokonce zvýšení jeho efektu. Cíleného efektu je možno dosáhnout, pokud je k léčivu připojena vhodná biologicky aktivní molekula, která je charakteristická zvýšenou afinitou k určité tělní tkáni. Aplikací dané látky dojde k jejímu navázání na cílovou tkáň, kde plní požadovanou funkci. Příkladem biologicky aktivní molekuly jsou jednoduché peptidy (například modifikované hormony podobné somatostatinu), polysacharidy, monoklonální protilátky, látky vážící se prostřednictvím hydrofobních interakcí nebo bisfosfonáty. Důležité je brát na vědomí i funkci tzv. spaceru, který spojuje biomolekulu s farmakem viz obr. 1. 3. Spacer může zásadně ovlivnit farmakokinetiku studované látky.⁽²³⁾



Obr. 1.3. Princip targetingu

(zdroj: <https://web.natur.cuni.cz/anorchem/19/Vyzkum.htm>)

1.2 Ligand NOTA a jeho deriváty

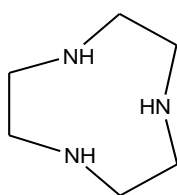
1,4,7-triazacyklononan je nejvíce používaný triazacyklus. Deriváty triazacyklononanu jsou hlavně používány pro komplexaci radionuklidů jako je $^{68}\text{Ga}(\text{III})$, $^{111}\text{In}(\text{III})$ nebo $^{64}\text{Cu}(\text{II})$.^(24,25) Nejznámější je ligand nesoucí tři pendantní ramena zakončené karboxylovou kyselinou známý jako ligand NOTA (1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-triazaoctová kyselina). Trifosfinátový derivát ligandu NOTA byl představen Kabachnikem v roce 1984. První fenylfosfinátový derivát ligandu TACN (NOTP^{Ph}) byl syntetizován v roce 1991 a fosfinátový derivát NOTP^{H} byl syntetizován v roce 1995. V dnešní době se zvýšil zájem o deriváty triazacyklononanů v souvislosti s používáním v medicíně. Výzkumy jsou zaměřeny na symetrické trifosfinátové deriváty jako bifunkční deriváty používané k targetingu biomolekul.⁽²⁶⁾

Ligand NOTA je hexadentátní ligand schopný tvořit oktaedrické komplexy s mnoha kovy. Tvoří stabilní komplexy s trojmocnými ionty jako $\text{Fe}(\text{III})$, $\text{Ga}(\text{III})$ a $\text{In}(\text{III})$. Stejně tak jsou známé i komplexy s dvojmocným iontem kovu $\text{Cu}(\text{II})$ a mnoha dalšími kovy z první přechodné řady.⁽²⁷⁾ Oproti tomu stabilita komplexů s lantanoidy a dalšími velkými ionty kovů je významně nižší.⁽²⁸⁾

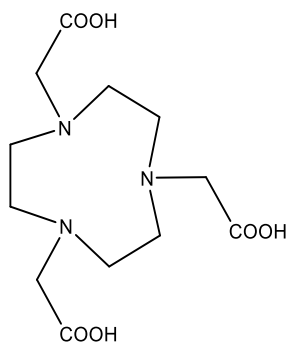
Významnými ligandy s optimálními koordinačními vlastnostmi jsou makrocikly mající na pendantních ramenech fosfonové nebo fosfinové skupiny, především ligand NOTP. V pevném stavu je ligand NOTP koordinován ve dvou různých stavech. První vypovídá o koordinaci kovového iontu přes atomy kyslíků fosfonátů. Druhý stav popisuje koordinaci kovového iontu třemi atomy dusíku makrociklu a třemi atomy kyslíku fosfonových skupin. V obou stavech mohou být nekoordinované atomy kyslíku fosfonátu protonizované.⁽²⁹⁾

Studuje se především chování komplexů různých fosfinátových ligandů; NOTP^{R} někdy také známého pod označením TRAP^{R} ; s $\text{Ga}(\text{III})$, $\text{Cu}(\text{II})$ nebo dalšími ionty kovů. Ligandy nesoucí proton (NOTP^{H}), fenyl (NOTP^{Ph}), hydroxymethyl (NOTP^{hm}) nebo 2-karboxyethyl (NOTP^{PrA}) vykazují větší termodynamickou selektivitu pro galité ionty než pro ionty ostatní. Stabilita komplexů s galiem jsou závislé na

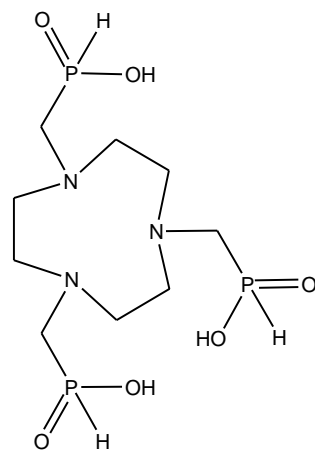
bazicitě donorových atomů. Tyto komplexy se vyznačují vysokým stupněm kinetické inertnosti. Ukázalo se, že komplexace izotopu ^{68}Ga probíhá při laboratorní teplotě a širokém rozpětí pH, dokonce při pH menší než 1.^(12,19) Podobné chování bylo objeveno pro ligandy NOPO, deriváty kombinující karboxymethylfosfinátová a hydroxymethylfosfinátová pendantní ramena.⁽³⁰⁻³²⁾ Vznik řady komplexů fosfinátových ligandů NOTPR s galitými ionty je rychlejší než v případě ligandu NOTA. Jedná se především o ligandy obsahující slabě koordinující karboxyethylové a hydroxymethylové skupiny v postranním řetězci. Ty komplexují rychleji při nižším pH a při nižších koncentracích.^(12,19) Pokud se k ligandu připojí silné chelatační skupiny, dojde ke snížení rychlosti vzniku komplexu. Dokonce při mnohonásobném navázání bisfosfonátového řetězce k ligandu se ion kovu nenaváže do kavity makrocyclu, ale je pouze komplexován fosfonátovými skupinami.⁽¹¹⁾



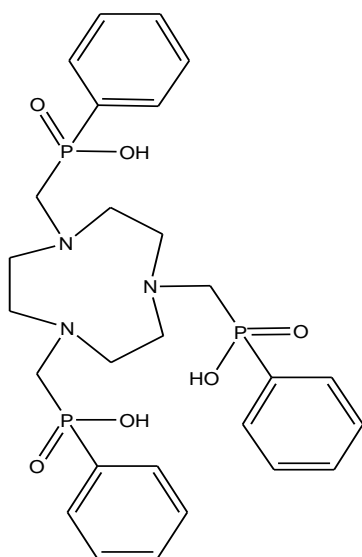
TACN



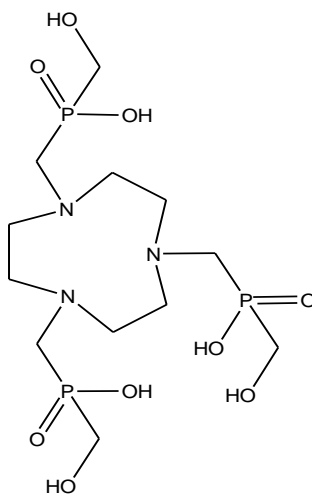
H₃NOTA



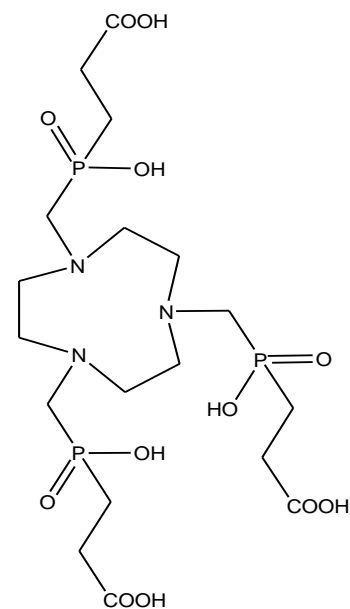
H₃NOTP^H



H₃NOTP^{Ph}



H₃NOTP^{hm}



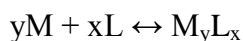
H₆NOTP^{PrA}

Obr. 1.4. Ligand NOTA a jeho deriváty

1.3 Termodynamická stabilita komplexů a rychlost komplexace

Ligandy vhodné pro použití v biomedicínských aplikacích by měly vykazovat vysokou termodynamickou stabilitu, kinetickou inertnost, vhodnou biodistribuci a vylučování.

Termodynamická stabilita je popisována rovnovážnou konstantou stability β . Základem komplexní sloučeniny je ion kovu (M), na který se naváže ligand (L) nebo více ligandů.



Daná reakce je popsána rovnovážnou konstantou stability β .⁽³³⁾

$$\beta_{M_yL_x} = \frac{[M_yL_x]}{[M]^y [L]^x}$$

Termodynamická stabilita komplexů diskutovaných derivátů TACN s galitými ionty je shrnuta v tabulce 1. 1. Stabilita komplexů je závislá na bazicitě donorových atomů^(12,19) a disociační konstantě. Čím vyšší disociační konstantu ligand má, tím je vyšší i konstanta stability.⁽³⁴⁾

Tab. 1. 1: Hodnoty konstant stabilit ($\log K_{GaL}$) s vybranými ligandy

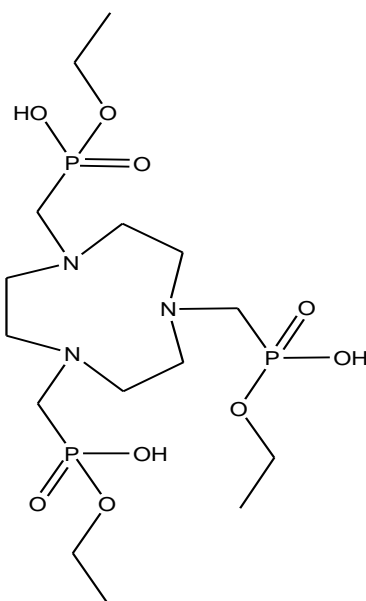
	NOTA	NOTP ^{PrA}	NOTP ^{hm}	NOTP ^H
$\log K_{GaL}$	29,6	26,24	23,3	21,9
pK_1	13,17	11,48	11,47	10,48

Ale *in vivo* prostředí není termodynamická stabilita rozhodující. Pro použití v medicíně je potřeba použít komplex, který je kineticky inertní. Nerozkládá se ani za termodynamicky nevhodných podmínek. Dále je potřeba, aby komplex vznikal v krátkém čase. U pomalé kinetiky vzniku je někdy nutnost využít složitých technik komplexace. Komplexace musí probíhat už při laboratorní teplotě, protože některé molekuly použité při targetingu se mohou zvýšenou teplotou snadno degradovat.⁽³⁵⁾

1.4 Cíl práce

V dnešní době se stále více studuje použití vhodných komplexů jako kontrastních látek pro biomedicínské aplikace. Komplex musí být termodynamicky stabilní a kineticky inertní. Zájem je především o makrocyclické ligandy, o deriváty ligandu NOTA.

Cílem diplomové práce byla syntéza monoesteru fosfonátového derivátu ligandu NOTA (obr. 1. 5). Připravený ligand byl charakterizován pomocí elementární analýzy. Dále byly stanoveny protonizační konstanty a konstanty stability daného ligandu s ionty kovů: Ga(III), Cu(II), Zn(II) a Ni(II). Byla studována rychlost komplexace ligandu NOTP^{OEt} s galitými ionty při různém pH. Dále byl charakterizován Cu^{2+} komplex pomocí UV-VIS spektroskopie.



Obr. 1. 5: Studovaný ligand $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

K syntéze byly použity chemikálie komerčních zdrojů; Sigma-Aldrich, Fluka, Lach:ner a Penta. Deionizovaná voda byla získána reverzní osmózou.

2.2 Použité přístroje

- **Elementární analýza**

Obsah uhlíku, vodíku a dusíku byl zjištěn na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd. Výsledky jsou uvedeny v hmotnostních procentech.

- **Spektroskopie nukleární magnetické rezonance**

^{71}Ga spektra byla měřena na spektrometru Varian_{UNITY} INOVA 400 a Bruker AVANCE III 400 MHz na PŘF UK. Byly použity 5mm kyvety. Teplota při měření byla 25 °C. Bylo použito deuterované rozpouštědlo D_2O (99,8% D, Chemotrade). Hodnoty chemických posunů pro ^{71}Ga NMR spektra jsou udány v ppm s přesností na jedno desetinné místo. Spektra byly referencována na vnitřní standart složený z 0,1M $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ a 1M $\text{Ga}(\text{OH})_3$ s chemickým posunem 222,4 ppm.

2.3 Syntéza $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$

V 50 ml baňce bylo rozpuštěno 2,03 g TACN (15,5 mmol) a 1,74 g paraformaldehydu (58,1 mmol) v 15 ml triethylfosfitu. Poté byla reakční směs míchána při teplotě 40 °C po dobu tří dnů. Po skončení reakce byl triethylfosfit odpařen na rotační vakuové odparce při teplotě 50 °C. Vzniklá směs byla nanesena na sloupec (3 x 15 cm) s DOWEX 50 (H^+ forma). Elucí pomocí EtOH byly odstraněny nežádoucí produkty. Následnou elucí pomocí směsi EtOH/ 25%ní NH_3 v poměru 1:1 byl poté vymyt produkt. Odpařením bylo získáno 3,99 g produktu, který byl rozpuštěn 50 ml 10% roztoku hydroxidu sodného. Reakční směs byla zahřívána při 50 °C po dobu jednoho dne. Po ochlazení byla směs nanesena na sloupec (3 x 20 cm) DOWEX 50 (H^+ forma) pro odstranění sodných iontů. Pomocí vody byl z kolony vymyt produkt. Po odpaření na vakuové rotační odparce byl produkt rozpuštěn ve 100 ml vody a lyofilizován. Výtěžek činil 1,53 g nažloutlé hygroskopické krystalické látky ve formě $\text{NaH}_2\text{NOTP}^{\text{OEt}} \cdot 3/2 \text{H}_2\text{O}$.

Charakterizace:

EA: ($\text{C}_{15}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{NaO}_9\text{P}_3 \cdot 3/2 \text{H}_2\text{O}$, $M_r = 527,37$): C 33,03 % (33,25 %), H 7,21 % (7,07 %) a N 7,70 % (7,45 %)

2.4 Potenciometrická měření

Zásobní roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 0,776 g ligandu $\text{NaH}_2\text{NOTP}^{\text{OEt}} \cdot 3/2\text{H}_2\text{O}$ v deionizované vodě ve 100 ml baňce. Přesná koncentrace ligandu byla zjištěna při výpočtu disociačních konstant.

Titrace a kalibrace byly prováděny při konstantní teplotě $25,0 \pm 0,1$ °C a při konstantní iontové síle 0,1 mol/l NMe_4Cl . Plynným argonem nasyceným vodní parou se vytvořila nad roztokem v nádobce inertní atmosféra. Objem titrovaného roztoku

se pohyboval okolo 5 ml. Směsi byly titrovány roztokem hydroxidu tetramethylamonného o koncentraci 0,23 mol/l. V průběhu každé titrace byl měřen potenciál skleněnou-Ag⁺/AgCl elektrodou značky GK 240B s přesností na 0,1 mV. pH metr PHM 240 byl použit jako voltmetr. Titrační roztok se přidával automatickou byretou ABU 900 o objemu 2 ml. Před začátkem měření byla elektroda střídavě ponořena do kyselého a bazického roztoku (1 M HCl a 1M KOH). Byrety s mikrometrickým šroubem o objemech 2,5 ml, 1,25 ml a 0,5 ml sloužily k přesnému pipetování kyseliny, roztoku ligandu a roztoku kovu. Koncentrace ligandu v nádobce se pohybovala okolo 4 mM. Před titrováním systému ligand: kov byla provedena poloautomatická titrace. Na základě této titrace byl nastaven dávkovací soubor. Při titracích se vynechala místa ležící v okolí bodu ekvivalence, důvodem je velká chyba při určení potenciálu. Veškerá data byla zpracována programem OPIUM.⁽³⁶⁾

2.5 UV- VIS spektroskopie

Do baniček bylo pipetováno 0,501 ml HCl o koncentraci 0,3 mol/l, 0,291 ml deionizované vody, 0,257 ml roztoku ligandu o koncentraci 0,016mol/l a 0,063 ml roztoku CuCl₂ o koncentraci 0,063 mol/l. pH bylo upraveno roztokem hydroxidu tetramethylamonného o koncentraci 0,23 mol/l na hodnoty 2, 4, 6, 8, 10 a 12. Byla měřena spektra ve viditelné oblasti v rozsahu vlnových délek 400 nm až 1100 nm. Pro měření spekter v UV oblasti (200–400 nm) se roztoky naředily v poměru 1:10 deionizovanou vodou.

2.6 NMR spektroskopie

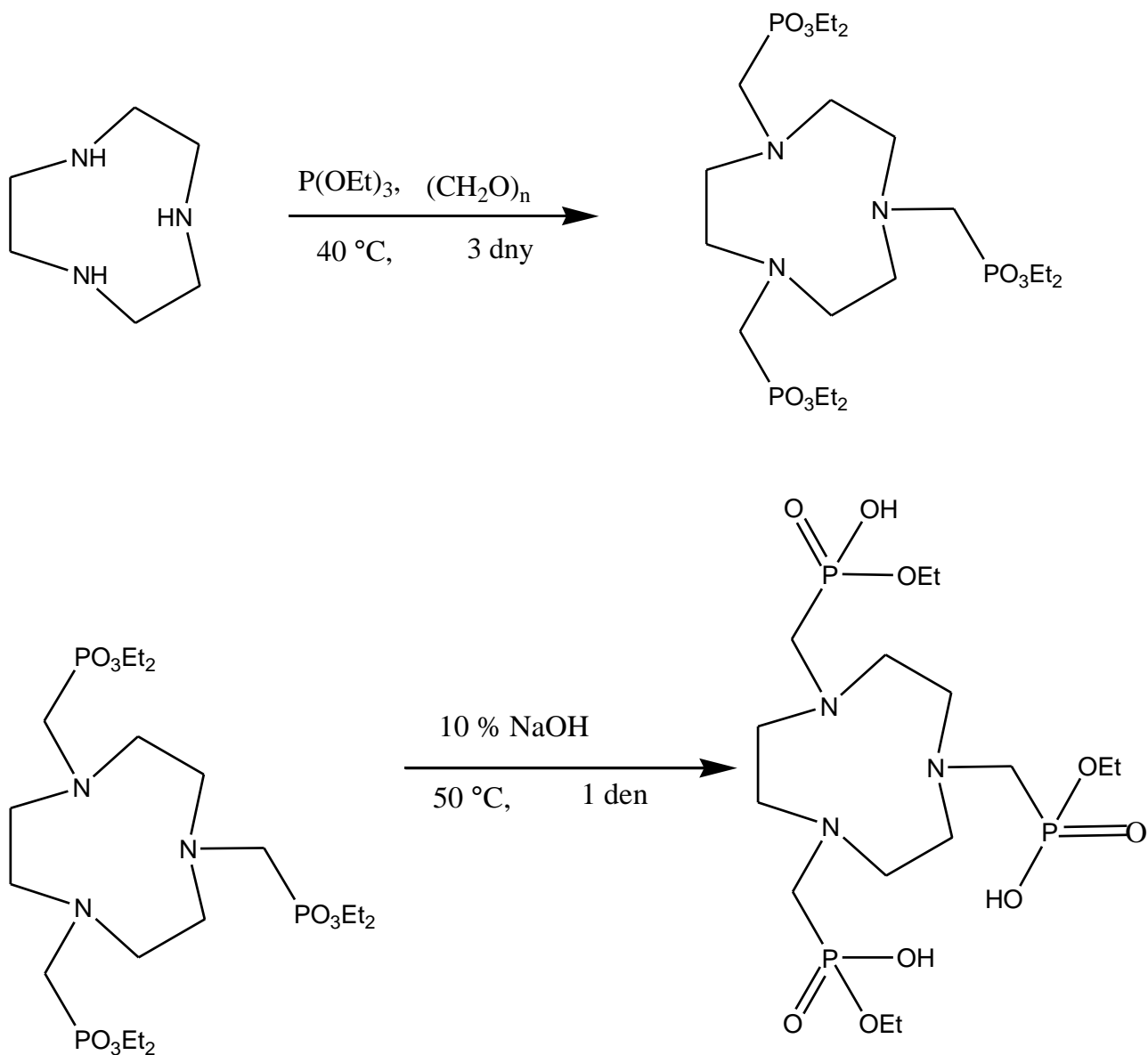
Do NMR kyvety bylo pipetováno 250 µl HClO₄ (0,2 mol/l nebo 2 mol/l) nebo 250 µl 2 mol/l pufru kyseliny monochloroctové o pH 2,8, 106,2 µl roztoku galitých

iontů o koncentraci 0,04706 mol/l a 143,8 μ l roztoku ligandu o koncentraci 0,03558 mol/l.

Byl použit standard galitých iontů o koncentraci 0,04706 mol/l. Standard byl připraven do insertu, kam byl napipetován roztok galitých iontů a zataven kvůli možné absorpci oxidu uhličitého. Insert byl vložen do skleněné NMR kyvety.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Syntéza ligandu $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$



Ligand $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ byl připraven ve dvou krocích. V prvním kroku byl připraven meziprodukt Et_6NOTP – ester fosfonátového derivátu NOTA smícháním TACN a paraformaldehydu v triethylfosfitu. Triethylfosfit byl odpařen a směs byla

nanesena na sloupec silného kationtového iontoměniče (H^+ forma), kde byly vymyty pomocí EtOH nežádoucí produkty. Samotný produkt byl vymyt směsí EtOH a 25% NH_3 v poměru 1:1. Meziprodukt nebyl dočišťován, ale výtěžek nedosahuje více jak 50%. Ztráta mohla být způsobena už při čistění reakční směsi od nežádoucích produktů nebo nedostatečným promytím a zachycením meziprojektu na koloně.

H_3NOTP^{OEt} byl připraven hydrolýzou v roztoku hydroxidu sodného. Pro odstranění sodných iontů byla směs čistěna na sloupci silného katexového iontoměniče. Produkt byl z kolony vymyt vodou. Následně byl lyofilizován. Výtěžek byl 1,53 g nažloutlé hygroskopické krystalické látky ve formě $NaH_2NOTP^{OEt} \cdot 3/2 H_2O$. Přítomnost sodných iontů lze vysvětlit, že při čistění na ionexu dochází k zachycení iontu v kavitě makrocyclu a následném vymytí ze sloupce.

3.2 Acidobazické vlastnosti

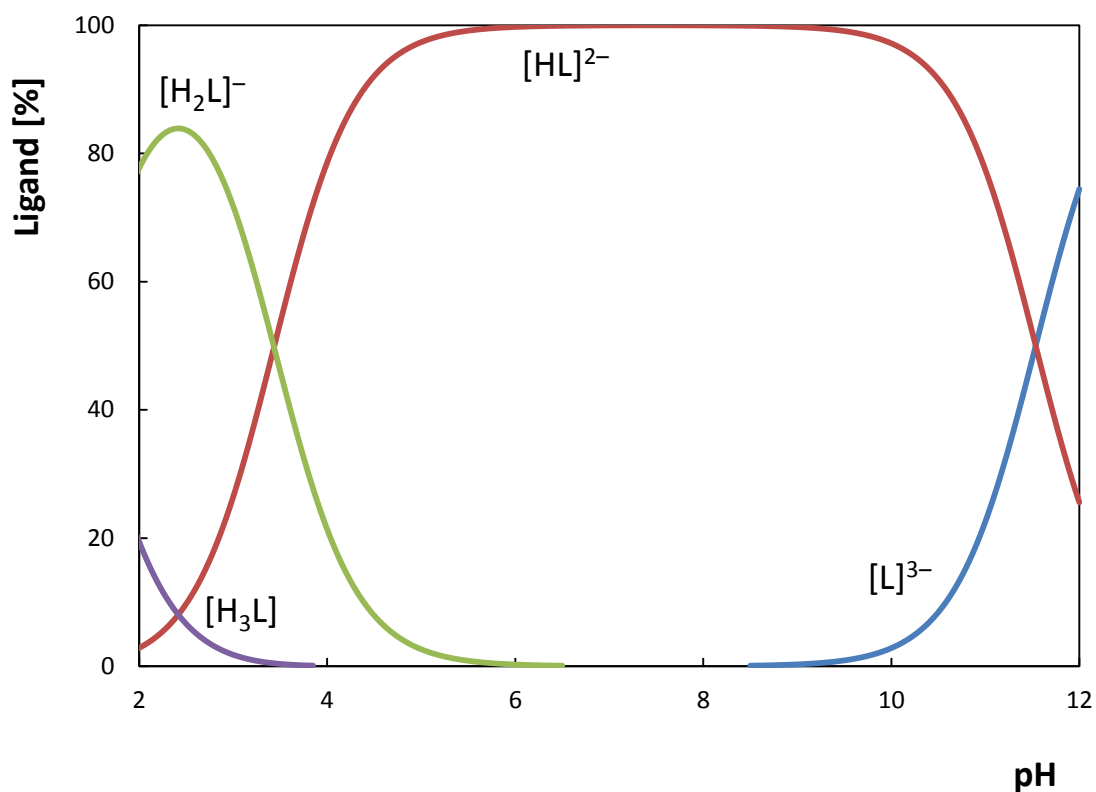
Potenciometrickými titracemi byly stanoveny protonizační konstanty ligandu H_3NOTP^{OEt} , které jsou shrnuty v tabulce 3. 1.

Tab. 3. 1: Protonizační konstanty ligandu H_3NOTP^{OEt} (25 °C, $I = 0,1$ mol/l)

	$\log\beta$	pK_A
$[HL]^{2-}$	$11,54 \pm 0,02$	11,54
$[H_2L]^-$	$14,97 \pm 0,05$	3,43
$[H_3L]$	$16,37 \pm 0,06$	1,40

V rozmezí pH 2 až 12 se v systému nacházely částice $[H_3L]$, $[H_2L]^-$, $[HL]^{2-}$ a $[L]^{3-}$ (obr.3.1). Plně protonizovaný ligand se v systému nachází pouze ve 20%

zastoupení a do pH 4 zcela vymizí. V systému převažuje částice $[\text{HL}]^{2-}$, která je ve 100% zastoupení od pH 6 do pH 10. Od pH 9 se objevuje plně deprotonizovaná částice $[\text{L}]^{3-}$, jejíž zastoupení s pH roste.



Obr.3.1: Distribuční diagram částic ligandu $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ v závislosti na pH (25 °C, $I = 0,1 \text{ mol/l}$, $c = 0,004 \text{ mol/l}$)

První i druhá konsektivní konstanta odpovídá deprotonizaci na atomech dusíku makrocyclu. Třetí hodnota poté odpovídá deprotonizaci fosfonátové skupiny.

Pro srovnání jsou v tabulce 3.2 uvedeny protonizační konstanty derivátů triazacyklononanu.

Tab. 3. 2 Disociační konstanty derivátů triazacyklononanu

	$\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$	$\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$	H_3NOTA	$\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{H}}$	$\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{Ph}}$	$\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{hm}}$	$\text{H}_6\text{NOTP}^{\text{PrA}}$
		[38]	[37]	[12]	[12]	[12]	[19]
$\text{p}K_1$	11,54	11,8	13,17	10,48	12,08	11,47	11,48
$\text{p}K_2$	3,43	3,65	5,18	3,28	3,24	3,85	5,44
$\text{p}K_3$	1,40	1,4	3,16	1,11	1,44	1,30	4,84
$\text{p}K_4$							4,23
$\text{p}K_5$							3,45
$\text{p}K_6$							1,66

Při porovnávání disociačních konstant příbuzných ligandů $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ je patrné, že nejvyšší hodnotu první protonizační konstanty vykazuje ligand NOTA. Ostatní konstanty nesou fosfinátový zbytek a tak jsou si i se svými protonizačními konstantami podobné. Při porovnání výsledků naměřených v naší laboratoři s výsledky převzatými z literatury⁽³⁸⁾ jsou odchylky nepatrné.

3.3 Koordinační vlastnosti

Potenciometrickými titracemi byly stanoveny konstanty stability komplexů ligandu $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ s ionty kovů Ni(II), Cu(II), Zn(II) a Ga(III). Pro měďnaté ionty a zinečnaté ionty byla provedena in-cell titrace. Kdežto pro nikelnaté ionty a galité

ionty byla provedena out-of-cell titrace kvůli pomalé komplexaci. Konstanty stability jsou shrnuty v tabulce 3. 3.

V systému $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}:\text{Cu}^{2+}$ se nachází dvě částice, $[\text{CuL}]^-$ a hydroxokomplex $[\text{CuL}(\text{OH})]^{2-}$. Od pH 4 až do pH 8 se ve 100% zastoupení nachází plně deprotonizovaná částice $[\text{CuL}]^-$. Od pH 9 je nahrazována hydroxokomplemem $[\text{CuL}(\text{OH})]^{2-}$ (obr. 3. 2).

Distribuční diagramy nikelnatých a zinečnatých iontů jsou zcela analogické distribučnímu diagramu měďnatých iontů. V obou případech vznikají dvě částice v systému. U nikelnatých iontů je to plně deprotonizovaná částice $[\text{NiL}]^-$ a hydroxokomplex $[\text{NiL}(\text{OH})]^{2-}$ (obr. 3. 3). V systému Zn(II) a $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ také jsou dvě částice, $[\text{ZnL}]^-$ a $[\text{ZnL}(\text{OH})]^{2-}$ (obr. 3. 4).

U galitých iontů se navíc v systému nachází jednou protonizovaná částice $[\text{GaHL}]^+$. Částice $[\text{GaL}]$ má 100 % zastoupení od pH 2 do pH 4. Hydroxokomplex $[\text{GaL}(\text{OH})]^-$ dosahuje maximálního 80 % zastoupení. Od pH 6 se v systému tvoří tetrahydroxygalitanový komplex $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ (obr. 3. 5).

Tab. 3. 3: Konstanty stability komplexu s $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ (25 °C, $I = 0,1 \text{ mol/l}$)

	Cu^{2+}		Ni^{2+}		Zn^{2+}		Ga^{3+}	
	$\log\beta$	pak	$\text{Log}\beta$	$\text{p}K_{\text{A}}$	$\text{Log}\beta$	$\text{p}K_{\text{A}}$	$\text{Log}\beta$	pak
$[\text{ML}]$	14,7(5)	-	14,86(15)	-	14,65(3)	-	20,54(31)	-
$[\text{M}(\text{HL})]$	-	-	-	-	-	-	22,25(34)	1,71
$[\text{ML}(\text{OH})]$	3,69(6)	11,01	2,88(16)	11,98	2,72(4)	11,93	14,07(16)	6,47

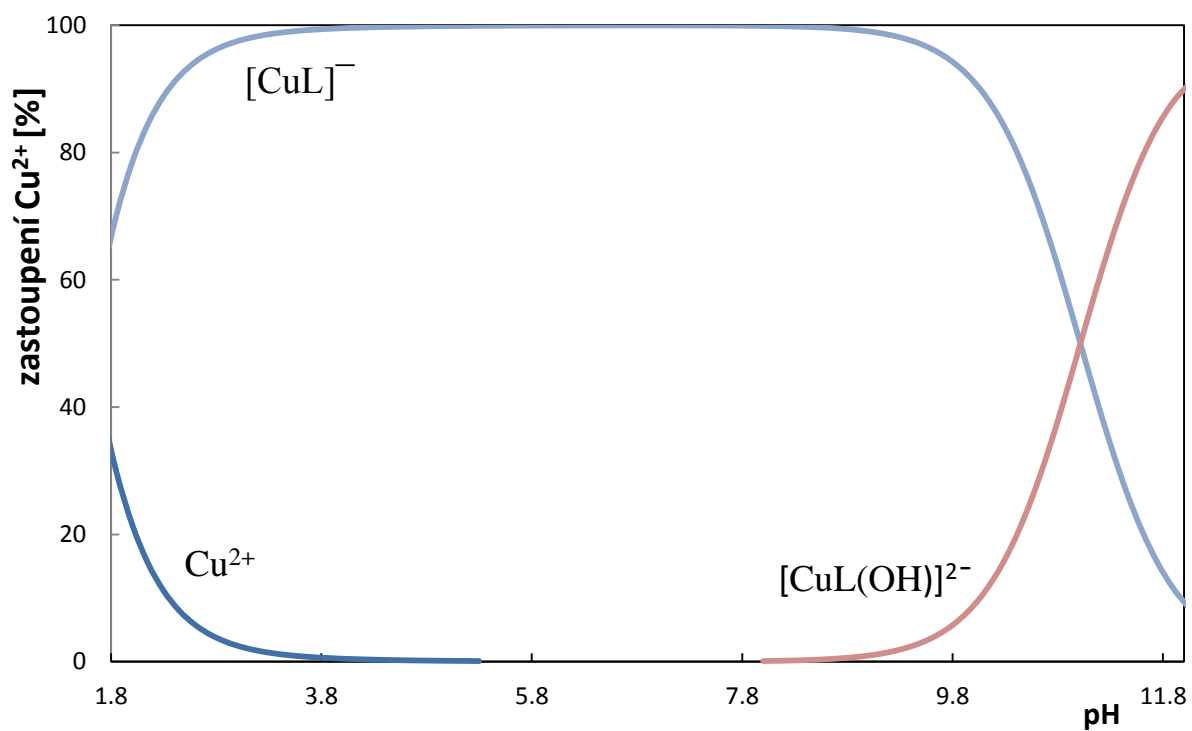
Nejvyšší konstantu stability vykazují galité ionty s ligandem $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$. Ionty galia jsou malé kladně nabitě ionty, které odpovídají svojí velikosti kavitě ligandu. Oproti ostatním iontům jsou trojmocné, což zvyšuje konstantu stability zhruba o pět jednotek.

Stabilita komplexů Cu^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} jsou srovnatelné. Pořadí stabilit by se ale mělo řídit Irwing-Williamsovou řadou ($\text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Zn}^{2+} \sim \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$). Stabilita Cu^{2+} komplexu v tomto případě Irwing-Williamsově řadě neodpovídá. V důsledku John-Tellerovské distorze Cu^{2+} preferuje koordinační okolí tetragonální bipyramidy. Deriváty TACN jsou však rigidní, což omezuje možnost prodloužení vazebných vzdáleností v axiálních polohách.

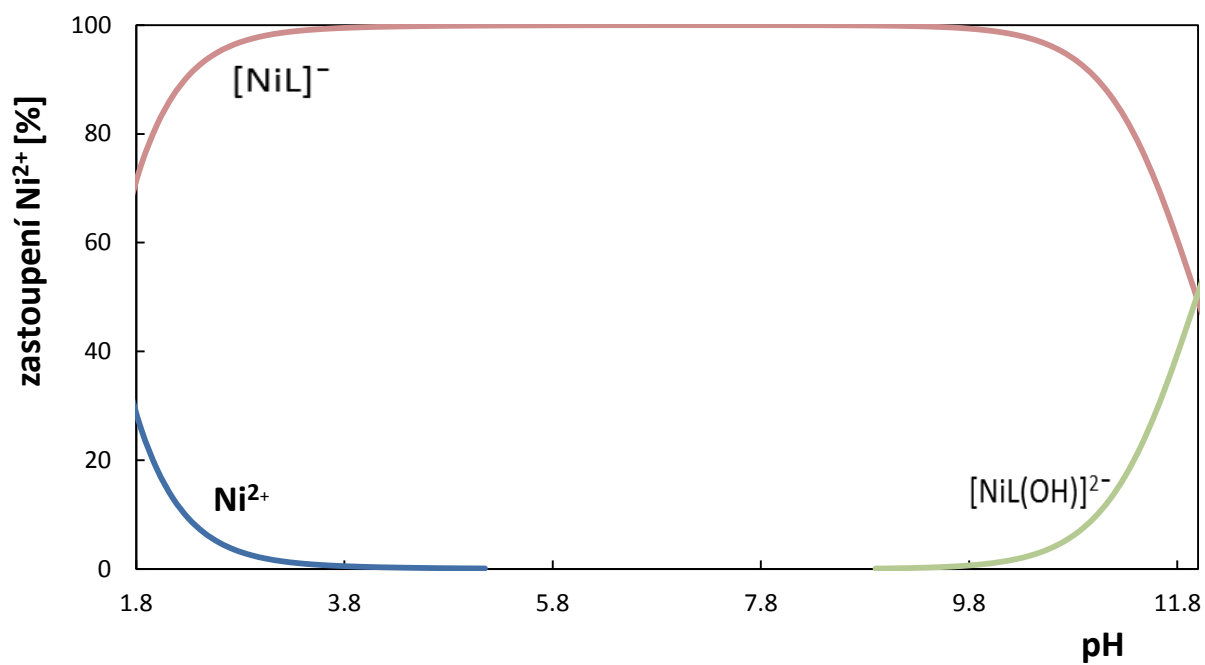
Při porovnávání konstant stabilit komplexů vybraných iontů kovů, Ga(III) , Cu(II) , Zn(II) a Ni(II) s příbuznými ligandy je pozorován stejný trend jako u ligandu $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$. Hodnoty stabilit jsou pro měďnaté, zinečnaté i nikelnaté prakticky stejné. Konstanty stability jsou ovlivněné hodnotou disociačních konstant ligandů. Ligand H_3NOTA má disociační konstantu nejvyšší, proto i všechny konstanty stability jsou nejvyšší.

Tab. 3. 4: Konstanty stability ($\log K_{\text{ML}}$) příbuzných ligandů $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$

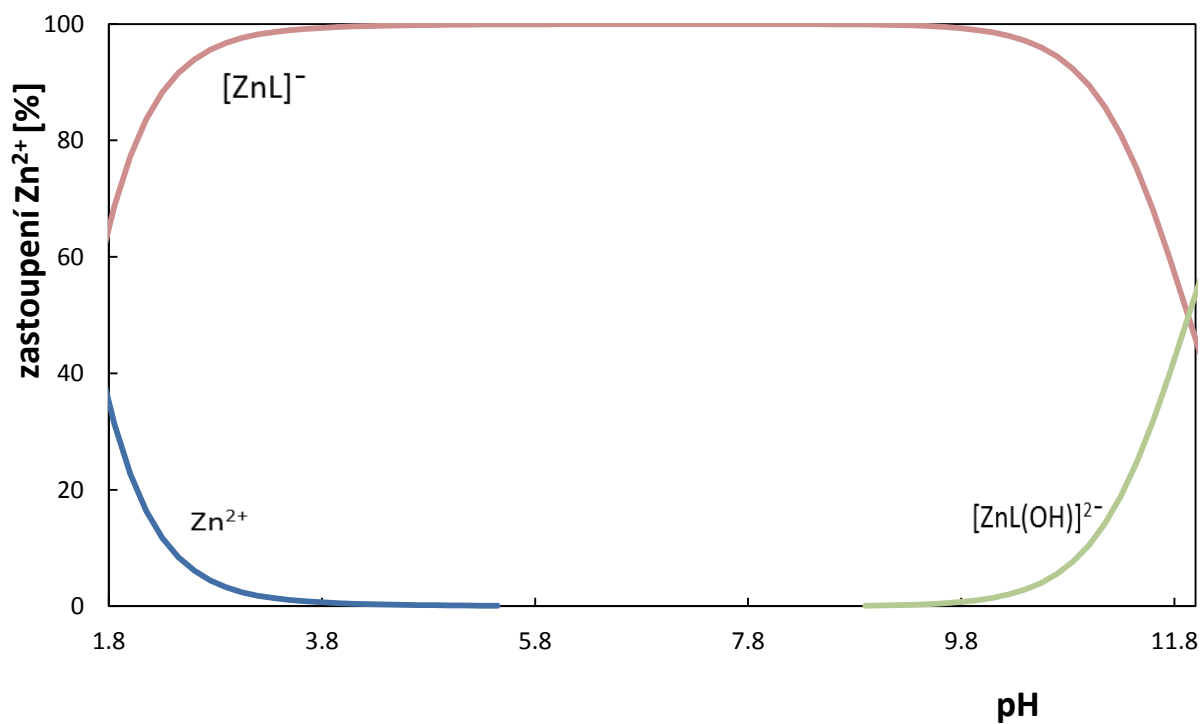
	$\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$	H_3NOTA	$\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{H}}$ [12]	$\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{PrA}}$ [12]
Ga^{3+}	20,54	29,63 ⁽¹²⁾	21,91	26,24
Cu^{2+}	14,7	21,99 ⁽³⁷⁾	13,43	16,85
Zn^{2+}	14,65	21,58 ⁽³⁷⁾	13,04	16,88
Ni^{2+}	14,86	19,24 ⁽³⁷⁾	13,40 ⁽³⁹⁾	-



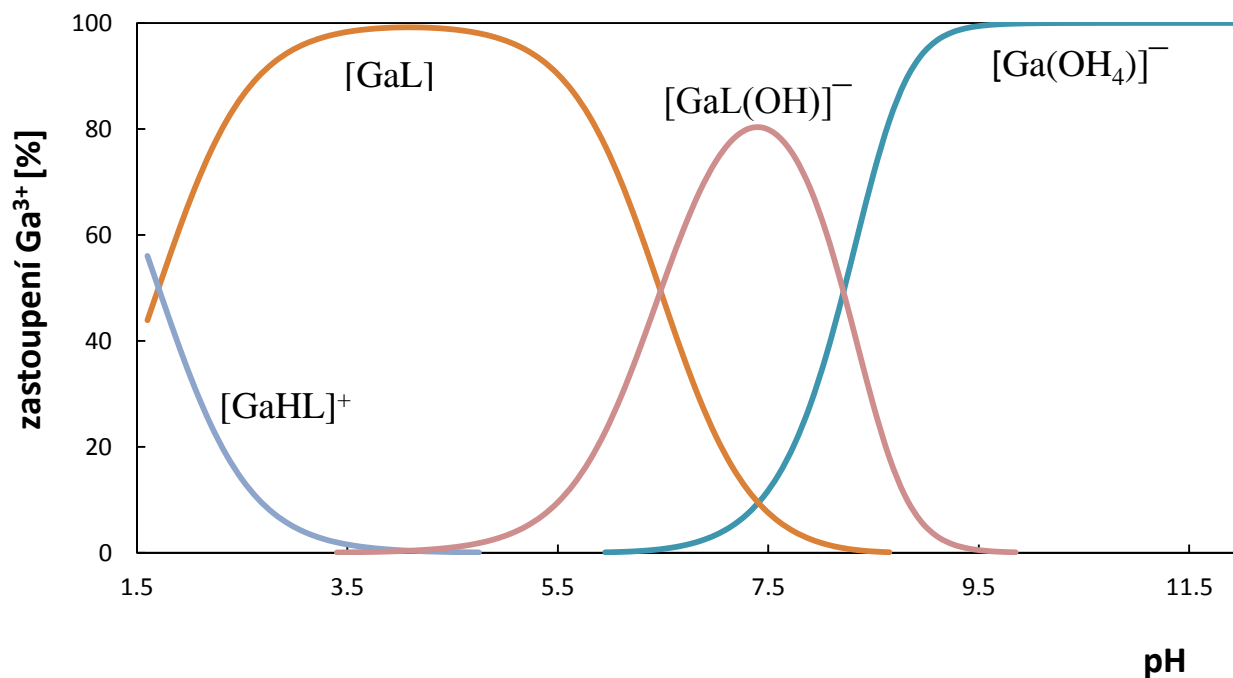
Obr. 3. 2: Distribuční diagram $\text{Cu}^{2+}:\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ (25 °C, $I=0,1$ mol/l, $c_{\text{Cu}^{2+}}=0,004$ mol/l, $c_{\text{lig}}=0,004$ mol/l)



Obr. 3. 3: Distribuční diagram $\text{Ni}^{2+}:\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ (25°C, $I= 0,1$ mol/l, $c_{\text{Ni}^{2+}}=0,004$ mol/l, $c_{\text{lig}}=0,004$ mol/l)



Obr. 3. 4: Distribuční diagram $\text{Zn}^{2+}:\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ ($25\text{ }^\circ\text{C}$, $I=0,1\text{ mol/l}$, $c_{\text{Zn}^{2+}}=0,004\text{ mol/l}$, $c_{\text{lig}}=0,004\text{ mol/l}$)



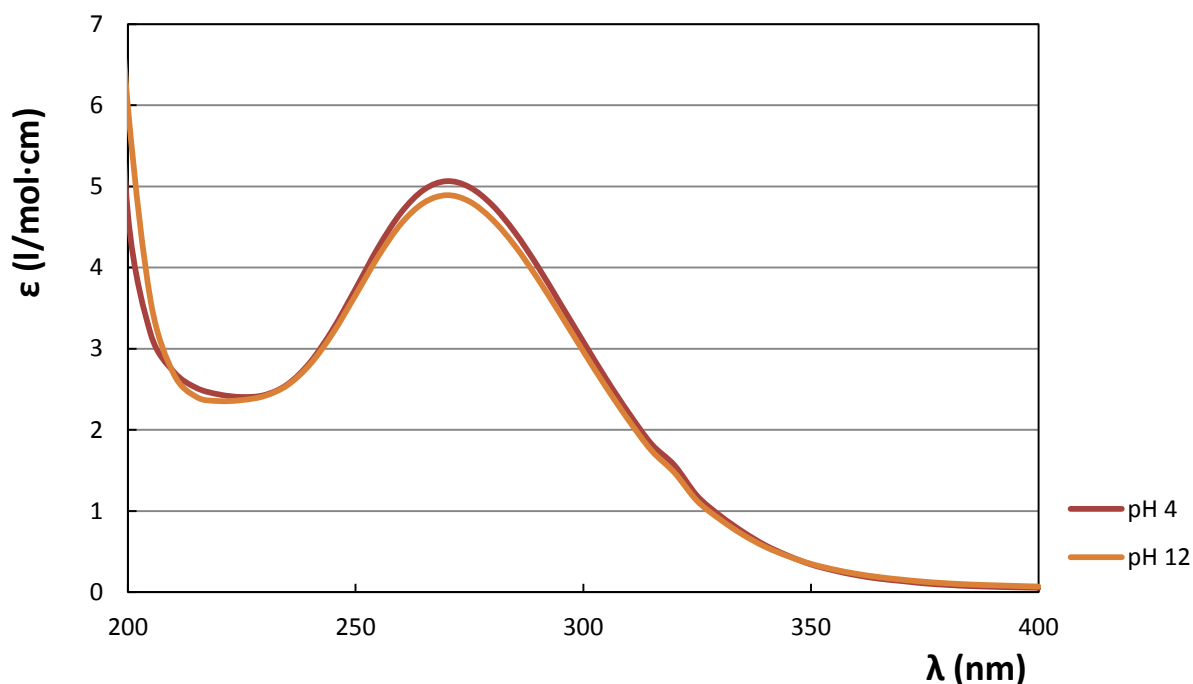
Obr. 3. 5: Distribuční diagram $\text{Ga}^{3+}:\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ (25°C , $I= 0,1\text{ mol/l}$, $c_{\text{Ga}^{3+}}= 0,004\text{ mol/l}$, $c_{\text{lig}}=0,004\text{ mol/l}$)

3.4 UV-VIS spektroskopie Cu^{2+} komplexu

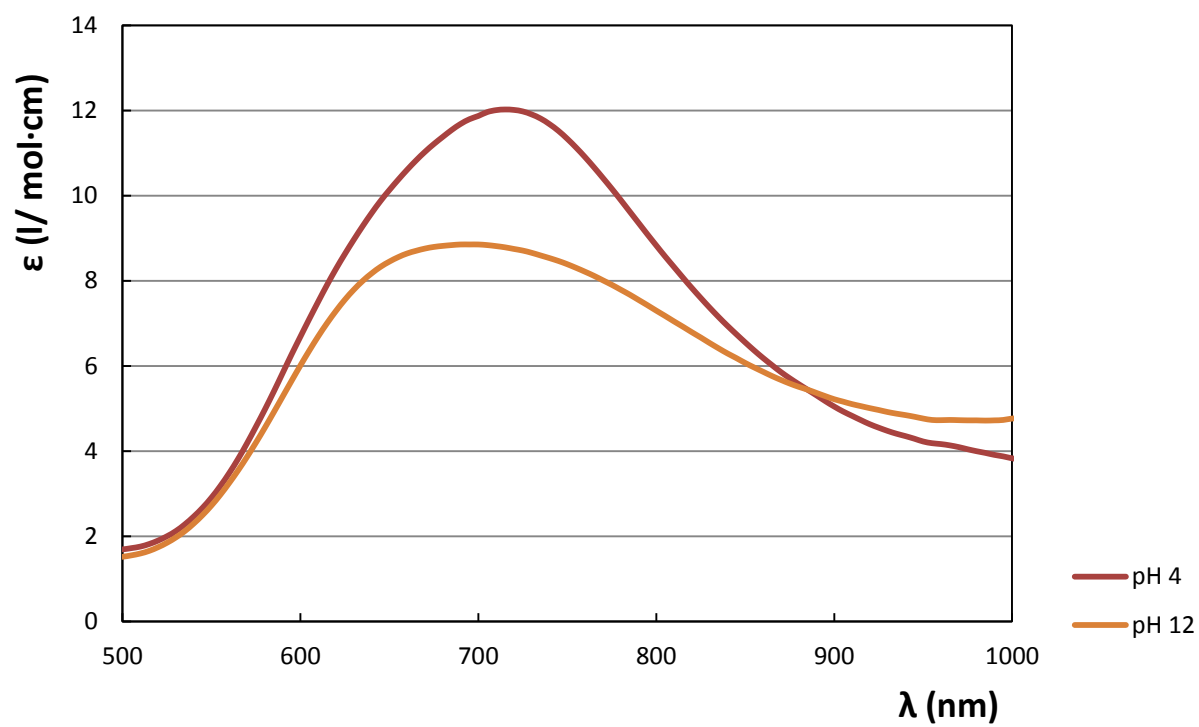
UV-VIS spektra komplexu $\text{Cu}^{2+}:\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ byla měřena v rozmezí vlnové délky 200 až 1000 nm v závislosti na pH 4–12.

V ultrafialové oblasti světla nedocházelo k velkým odchýlkám. Křivka pro pH 4 až 10 jsou prakticky stejná. Menší změnu vykazovalo spektrum při pH 12. V bodě maxima molární absorpční koeficient je $\epsilon_{270}=5,06 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ pro pH 4 a $\epsilon_{270}=4,89 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ pro pH 12 (obr. 3. 6).

Ve viditelné oblasti v rozmezí pH 4–10 nedochází k žádným změnám. Ale pozorovatelná změna nastává v případě pH 12 (obr. 3. 7). Příčina změny molárního absorpčního koeficientu a vlnové délky maxima je výměna pendantu za hydroxylovou skupinu. Maximum při pH 4 je $\epsilon_{715}=12,02 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$ a při pH 12 je $\epsilon_{700}=8,85 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$.



Obr. 3. 6: Absorpční spektra v UV oblasti systému $\text{Cu}^{2+}:\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ (25 °C)



Obr. 3. 6: Absorpční spektra systému $\text{Cu}^{2+}:\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ ve viditelné oblasti (25 °C)

3.5 Formace Ga^{3+} komplexu

Rychlost komplexace ligandu $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ s galitými ionty byla měřena pomocí ^{71}Ga NMR spektroskopie. Spektrum bylo referencováno pomocí externího standardu galitých iontů $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ se signálem 222,4 ppm. Signál s chemickým posunem 120,6 ppm odpovídá komplexu, kde je ion kovu vázán v dutině makrocyklu. Signál při 0 ppm odpovídá galitým iontům ve formě hexaaquagalitého komplexu $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$. Signál při -31,6 ppm lze přiřadit out-of-cage meziproduktu, kdy jsou galité ionty pravděpodobně komplexovány pouze pendantními rameny ligandu. U pH 0 a 1 se vyskytují všechny čtyři výše zmíněné signály (obr. 3. 8 a obr. 3. 9). U pH 2,8 se nachází pouze signály standardu galitých iontů a komplexu. Signál volného Ga^{3+} nelze zaznamenat v důsledku interakce s pufrům a nízké symetrii částic, která vede k extrémnímu rozšíření signálu (obr. 3. 10).

V tabulce 3. 5 jsou vypočteny hodnoty času, kdy byl komplex v systému z 50% přítomný. Jelikož nelze zaznamenat přesnou hodnotu vzniku 100% komplexu v systému, byl spočítán komplex v 98% zastoupení.

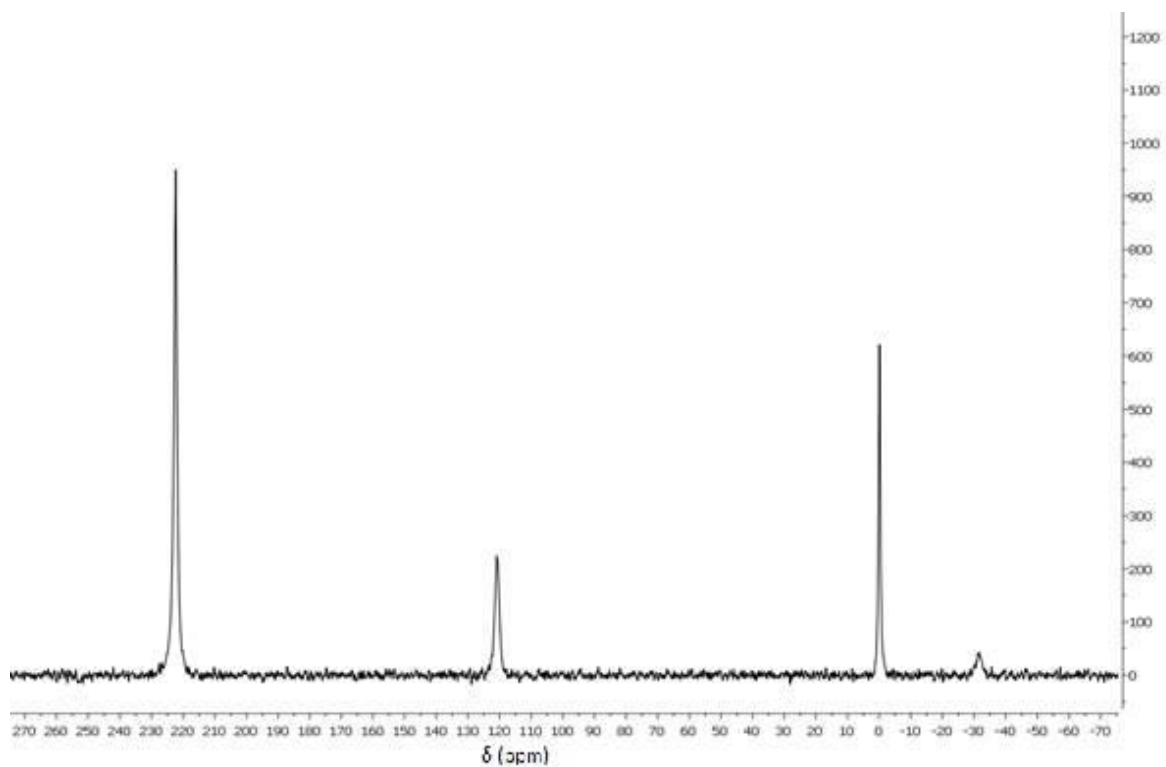
Hodnoty byly získány vynesemím procentuálního zastoupení komplexu v závislosti na čase. Rychlost komplexace je závislá na pH. Při pH 2,8 se ligand s galitými ionty zakomplexuje rychleji než při pH 1 a 0. 100 % formace ligandu $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ s galitými ionty byla ustálena po 76 dnech při pH 0 (obr. 3. 11). U pH 1 byla komplexace rychlejší, 100 % zastoupení komplexu v systému bylo dosaženo už po čtyřech dnech (obr. 3. 12). Nejrychleji probíhala komplexace při pH 2,8, kdy už po třech hodinách byl v systému 100 % komplex (obr. 3. 13).

Rychlost komplexace NOTP^{OEt} je srovnatelná s NOTP^{H} . Je však pomalejší než pro ostatní studované systémy. Vyšší rychlost u ligandů NOTP^{hm} a NOTP^{PrA} lze vysvětlit přítomností dalších koordinujících skupin na pendantních ramenech, která zvyšují stabilitu reakčních intermediátů.

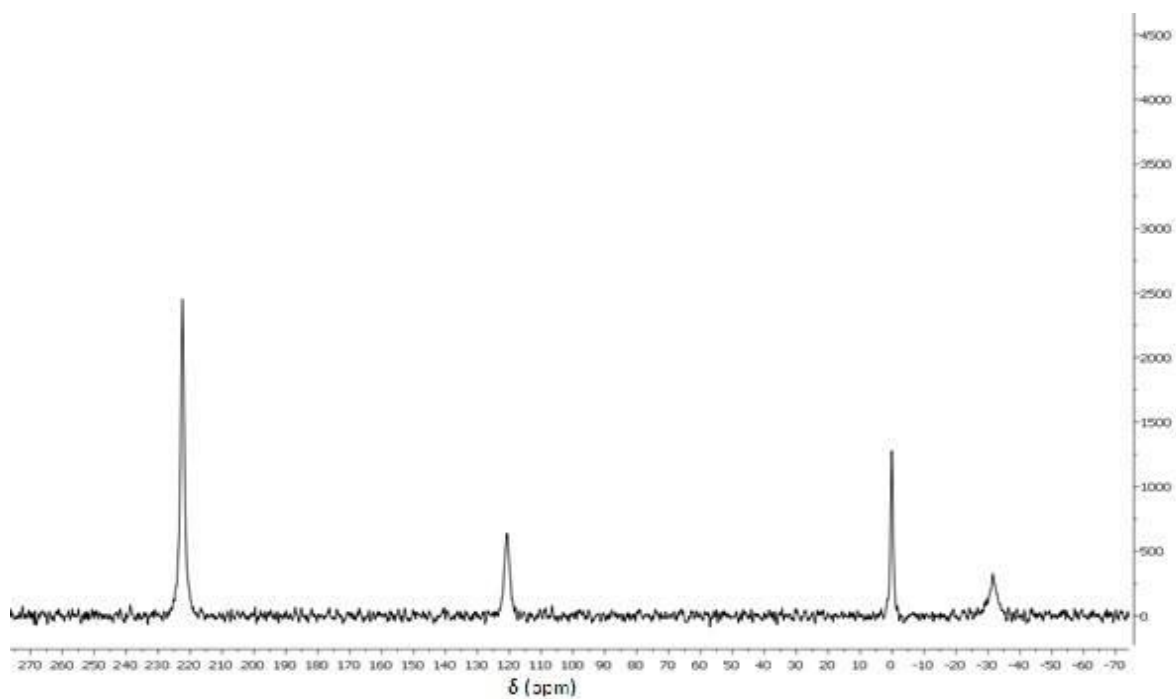
Tab. 3. 6: τ 50 % zastoupení komplexu v systému a τ 100 % zastoupení komplexu v systému ligandu NOTP^{OE_t} a příbuzných ligandů (25 °C)

Ligand	pH	T _{50%}	$\tau_{100\%}$
NOTP ^{OE_t}	2,8	5 min	3 hod
	1	3 hod	4 dny
	0	15 dní	76 dní
NOTA [12]	2,8	<i>a</i>	<5 min
	1	270 min	6 dní
	0	<i>b</i>	<i>b</i>
NOTP ^{hm} [12]	2,8	<i>a</i>	<5 min
	1	14 min	60 min
	0	3,8 dní	31 dní
NOTP ^{PrA} [19]	2,8	<i>a</i>	<5 min
	1	3 min	12 min
	0	-	12dní
NOTP ^H [12]	2,8	30 min	220 min
	1	21 h	15 dní
	0	36 dní	240 dní

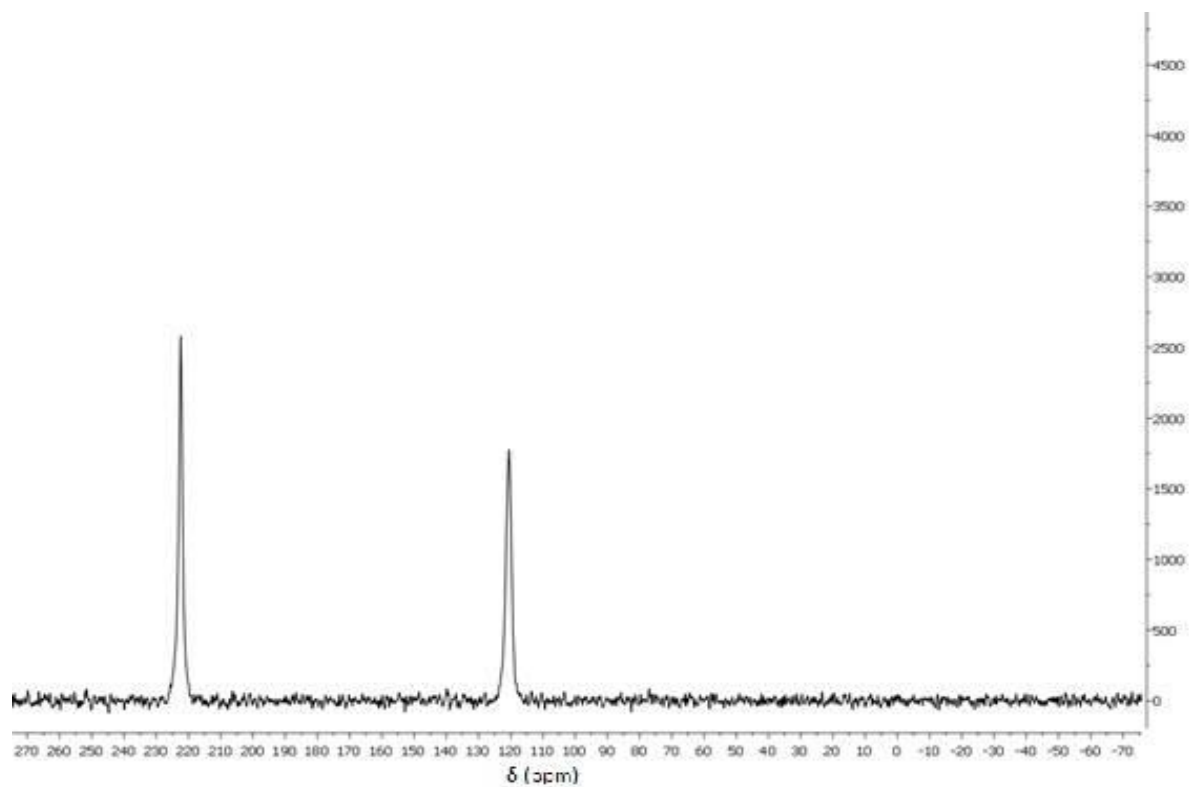
^a Nelze změřit, komplexace je příliš rychlá. ^b Nebyla pozorována žádná reakce



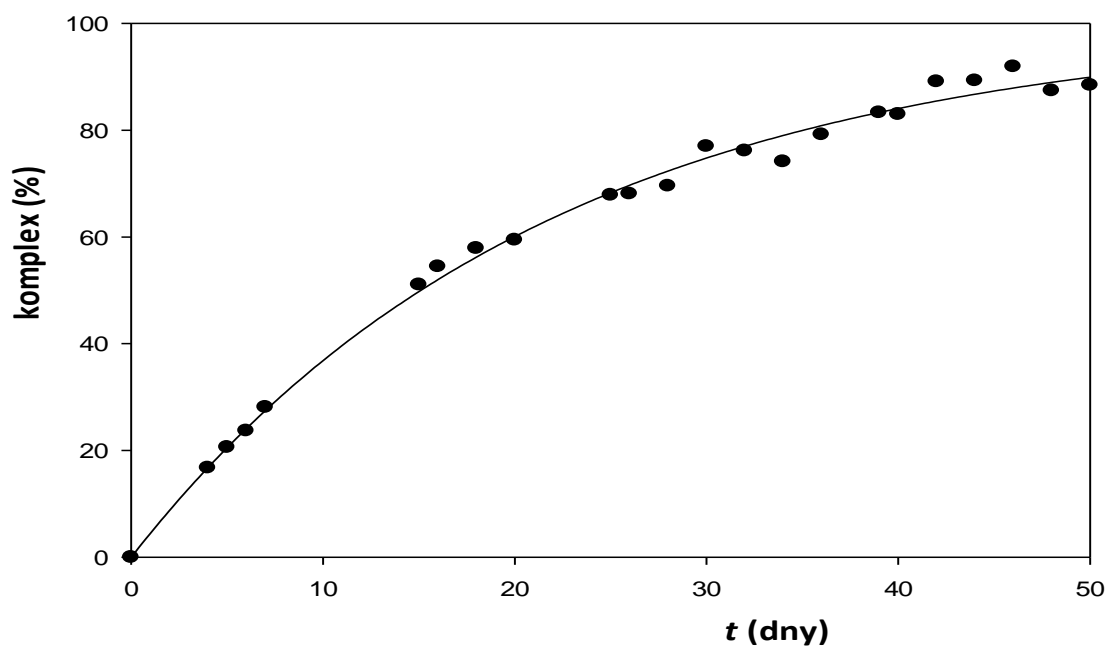
Obr. 3. 8: ^{71}Ga NMR spektrum získaného během komplexace galitých iontů s ligandem $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ při pH 0



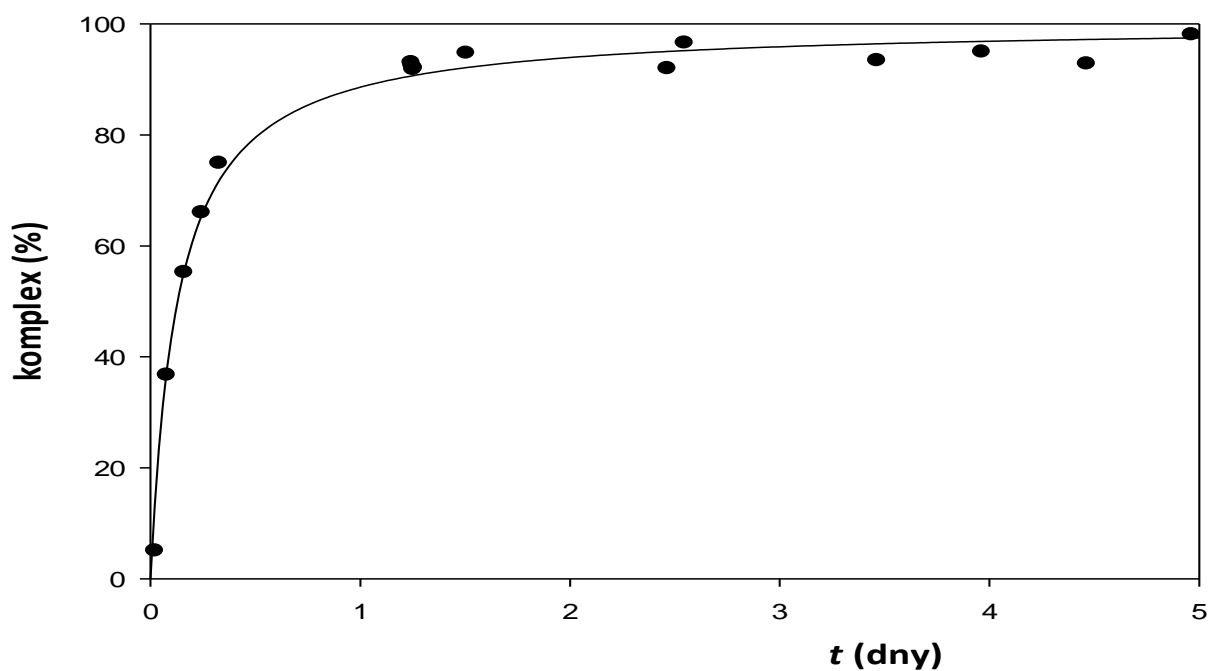
Obr. 3. 9: ^{71}Ga NMR spektrum získaného během komplexace galitých iontů s ligandem $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ při pH 1



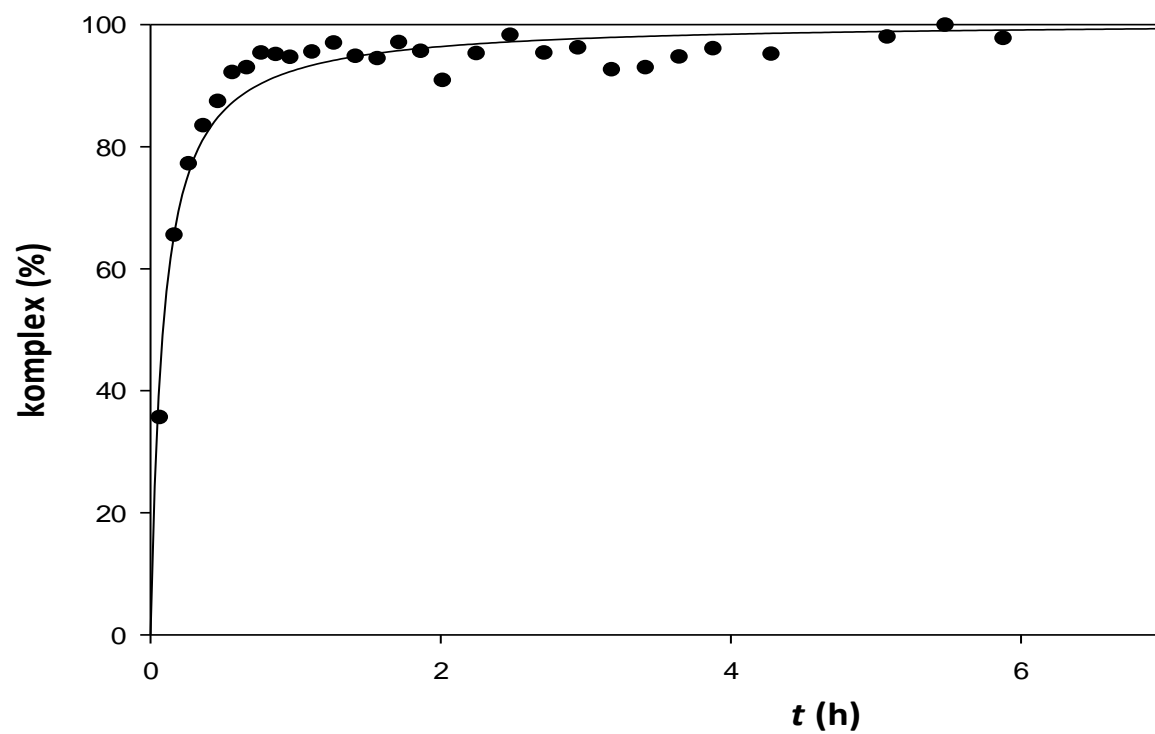
Obr. 3. 10: ^{71}Ga NMR spektrum získané během komplexace galitých iontů s ligandem $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ při pH 2,8



Obr. 3. Formace $\text{Ga}^{3+}:\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ komplexu při pH 1 ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_{\text{Ga}^{3+}} = 0,01\text{ mol/l}$, $c_{\text{lig}} = 0,01\text{ mol/l}$)



Obr. 3. 12: Formace $\text{Ga}^{3+}:\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ komplexu při pH 1 ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_{\text{Ga}^{3+}} = 0,01\text{ mol/l}$, $c_{\text{lig}} = 0,01\text{ mol/l}$)



Obr. 3. 13: Formace $\text{Ga}^{3+}:\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ komplexu při pH 2,8 (25 °C, $c_{\text{Ga}^{3+}} = 0,01 \text{ mol/l}$, $c_{\text{lig}} = 0,01 \text{ mol/l}$)

4 Závěr

Byla provedena syntéza ligandu $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$. Byly stanoveny potenciometrickými titracemi disociační konstanty studovaného ligandu a konstanty stability komplexů ligandu $\text{H}_3\text{NOTP}^{\text{OEt}}$ s ionty kovů, Cu(II) , Zn(II) , Ni(II) a Ga(III) . Nejvyšší hodnotu stability vykazoval komplex galitých iontů.

Dále byla měřena UV–VIS spektra měďnatého komplexu. V ultrafialové oblasti nedocházelo k žádným změnám. Ve viditelné oblasti se mění spektrum v bazické oblasti. Důvodem je výměna pendantního ramene za hydroxylovou skupinu na iontu Cu^{2+} .

Rychlost komplexace Ga^{3+} iontů byla sledována pomocí ^{71}Ga NMR spektroskopie pro pH 0, 1 a 2,8. Rychlost stoupá s pH. Komplexace je výrazně pomalejší než pro ligand H_3NOTA .

5 Literatura

1. Kotek, J; Lukeš, I.: Cheláty pro využití v biomedicinských oborech. *Chem. Listy* **104**, 1163–1179 (2010).
2. Notni, J; Hermann, P; Dregely, I; Wester, H., J.: *Convenient Synthesis of ^{68}Ga -Labeled Gadolinium (III) Complexes: Towards Bimodal Responsive Probes for Functional Imaging with PET/MRI*. *Chem. Eur. J.* **19**, 12602 – 12606 (2013).
3. Fellner, M.; Riss, P.; Loktionova, N.; Zhernosekov, K.; Thews, O.; Geraldès, C. F. G. C.; Kovacs, Z.; Lukeš, I.; Rösch, F.: *Comparison of different phosphorus-containing ligands complexing ^{68}Ga for PET-imaging of bone metabolism*. *Radiochim. Acta* **99**, 43–51 (2011).
4. Morfin, J-F; Tóth, E.: Kinetics of Ga(NOTA) Formation from Weak Ga-Citrate Complexes. *Inorg. Chem.* **50**, 10371–10378 (2011).
5. Sandhöfer, B.; Meckel, M.; Delgado-López, J-M.; Patrício, T.; Tampieri, A.; Rösch, F.; Lafisco, M.: *Synthesis and Preliminary in Vivo Evaluation of Well-Dispersed Biomimetic Nanocrystalline Apatites Labeled with Positron Emission Tomographic Imaging Agents*. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 10623–10633 (2015).
6. Wadas, T., J.; Wong, E., H.; Weisman, G., R.; Anderson, C., J.: *Coordination of radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease*. *Chem. Rev.* **110**, 2858–2902 (2010).
7. Welch, M., J.; Moerlein, S.: *Radiolabeled Compounds of Biomedical Interest Containing Radioisotopes of Gallium and Indium*. *Inorg. Chem. in Biol. Med.*, 121-140 (2009).
8. Notni, J.; Plutnar, J.; Wester, H.-J.: *Bone-seeking TRAP conjugates: surprising observations and their implications on the development of gallium-68-labeled bisphosphonates*. Notni et al. *EJNMMI Research* **2**:13 (2012).

9. Li, Z.; Conti, P., S.: *Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography*. Advanced Drug Delivery Reviews **62**, 1031–1051 (2010).
10. David, T.; Kubíček, V.; Gutten, O.; Lubal, P.; Kotek, J.; Pietzsch, H.-J.; Rulíšek, L.; Hermann, P.: *Cyclam Derivatives with a Bis(phosphinate) or a Phosphinato–Phosphonate Pendant Arm: Ligands for Fast and Efficient Copper(II) Complexation for Nuclear Medical Applications*. Inorg. Chem. **54**, 11751–11766 (2015).
11. Holub, J.; Meckel, M.; Kubíček, V.; Rösch, F.; Hermann, P.: *Gallium(III) complexes of NOTA-bis (phosphonate) conjugates as PET radiotracers for bone imaging*. Contrast Media Mol. Imaging **10**, 122–134 (2015).
12. Šimeček, J.; Wester, H.-J.; Notni, J.: *Copper-64 labelling of triazacyclononane-triphosphinate chelators*. Dalton Trans. **41**, 13803–13806 (2012).
13. Blower, P., J.; Lewis, J. S.; Zweit, J.: *Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine*. Nucl. Med.&Biol. **23**, 957–980 (1996).
14. Šimeček, J.; Schulz, M.; Notni, J.; Plutnar, J.; Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Hermann, P.: *Complexation of metal ions with TRAP (1,4,7-triazacyclononane phosphinic acid) ligands and 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid: Phosphinate-containing ligands as unique chelators for trivalent galium*. Inorg. Chem. **51**, 577–590 (2012).
15. Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Tircsó, G.; Hermann, P.; Tóth, E.; Lukeš, I.: *Gallium(III) Complexes of DOTA and DOTA-Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies*. Inorg. Chem. **49**, 10960–10969 (2010).
16. Alshoukr, F.; Prignon, A.; Brans, L.; Jallane, A.; Mendes, S.; Talbot, J.-M.; Tourwé, D.; Barbet, J.; Gruaz-Guyon, A.: *Novel DOTA-Neurotensin Analogues for ¹¹¹In Scintigraphy and ⁶⁸Ga PET Imaging of Neurotensin Receptor-Positive Tumors*. Bioconjugate Chem. **22**, 1374–1385 (2011).
17. Fellner, M.; Biesalski, B.; Bausbacher, N.; Kubíček, V.; Hermann, P.; Rösch, F.; Thews, O.: *⁶⁸Ga-BPAMD: PET-imaging of bone metastases with a generator based positron emitter*. Nuclear Medicine and Biology **39**, 993–999 (2012).

18. Notni, J.; Pohle, K.; Wester, H.-J.: *Comparative gallium-68 labeling of TRAP-, NOTA-, and DOTA-peptides: practical consequences for the future of gallium-68-PET*. Notni et al. EJNMMI Research 2:28 (2012).
19. Notni, J.; Hermann, P.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Kubiček, V.; Plutnar, J.; Loktionova, N.; Riss, P., J.; Rösch, F.; Lukeš, I.: *A Triazacyclononane-Based Bifunctional Phosphinate Ligand for the Preparation of Multimeric ^{68}Ga Tracers for Positron Emission Tomography*. Chem. Eur. J. **16**, 7174–7185 (2010).
20. Drahoš, B.; Kubiček, V.; Bonnet, C., S.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth, É.: *Dissociation kinetics of Mn^{2+} complexes of NOTA and DOTA*. Dalton Trans. **40**, 1945–1951 (2011).
21. Huskens, J.; Sherry, A., D.: *Co-ordination chemistry and molecular mechanics study of the magnesium(II) and calcium(II) complexes of trisubstituted 1,4,7-triazacyclononane derivatives*. J. Chem. Soc., Dalton Trans., 177–184 (1998).
22. Studer, M.; Meares, C., F.: *Synthesis of Novel 1,4,7-Triazacyclononane- N,N,N' -triacetic Acid Derivatives Suitable for Protein Labeling*. Bioconjugate Chem. **3**, 337–341 (1992).
23. <https://web.natur.cuni.cz/anorchem/19/vyzkum.htm>
24. Broan, C., J.; Cox, J., P., L.; Craig, A., S.; Kataký, R.; Parker, D.; Harrison, A.; Randall, A., M.; Ferguson, G.: *Structure and Solution Stability of Indium and Gallium Complexes of 1,4,7-Triazacyclononanetriacetate and of Yttrium Complexes of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecanetetraacetate and Related Ligands: Kinetically Stable Complexes for Use in Imaging and Radioimmunotherapy. X-Ray Molecular Structure of the Indium and Gallium Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triacetic Acid*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. **2**, 87–99 (1991).
25. Velikyan, I.; Maecke, H.; Langstrom, B.: *Convenient Preparation of ^{68}Ga -Based PET-Radiopharmaceuticals at Room Temperature*. Bioconjugate Chem. **19**, 569–573 (2008)
26. Cole, E.; Parker, D.; Ferguson, G.; Gallagher, J., F.; Kaitner, B.: *Synthesis and Structure of Chiral Metal Complexes of Polyazacycloalkane Ligands*

- Incorporating Phosphinic Acid Donors*. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1473–1475 (1991).
27. Bevilacqua, A.; Gelby, R., I.; Hebard, W., B.; Zompa, L., J.: *Equilibrium and thermodynamic study of the aqueous complexation of 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid with protons, alkaline-earth-metal cations, and copper(II)*. Inorganic Chemistry **26**, 2699–2706 (1987).
 28. Brucher, E.; Sherry, A., D.: Kinetics of formation and dissociation of the 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetate complexes of cerium(III), gadolinium(III), and erbium(III) ions. Inorg. Chem. **29**, 1555–1559 (1990).
 29. Clegg, W.; Iveson, P., B.; Lockhart, J., C.: *Macrocyclic Ligands with Pendant Phosphonic Acid Groups*. J. Chem. Soc. Dalton Trans., 3291–3298 (1992).
 30. Šimeček, J.; Zemek, O.; Hermann, P.; Wester, H.-J.; Notni, J.: *A Monoreactive Bifunctional Triazacyclononane Phosphinate Chelator with High Selectivity for Gallium-68*. ChemMedChem **7**, 1375–1378 (2012).
 31. Šimeček, J.; Zemek, O.; Hermann, P.; Notni, J.; Wester, H.-J.: *Tailored Gallium(III) Chelator NOPO: Synthesis, Characterization, Bioconjugation, and Application in Preclinical Ga-68-PET Imaging*. Mol. Pharmaceuticals **11**, 3893–3903 (2014).
 32. Notni, J.; Šimeček, J.; Wester, H.-J.: *Phosphinic Acid Functionalized Polyazacycloalkane Chelators for Radiodiagnostics and Radiotherapeutics: Unique Characteristics and Applications*. ChemMedChem **9**, 1107 – 1115 (2014).
 33. Opekar, F.: *Základní analytická chemie*. vyd. Praha, Karolinum 2003.
 34. Kotek, J.: *Habitační práce*. Univerzita Karlova v Praze 2009.
 35. Boswell, C., A.; Sun, X.; Niu, W.; Weisman, G., R.; Wong, E., H.; Rheingold, A., L.; Anderson, C.J.: *Comparative in Vivo Stability of Copper-64-Labeled Cross-Bridged and Conventional Tetraazamacrocyclic Complexes*. Journal of Medicinal Chemistry **47**, 1465–1474 (2004).
 36. Kývala, M.; Lukeš, I.: *International conference chemometrics '95*, p. 63. Pardubice, Czech Republic, 1995.
 37. Poláková, Z.: *Bakalářská práce*, katedra anorganické chemie PřF UK (2014).

38. Ramasamy, R.; Lazar, I.; Brücher, E.; Sherry, A., D.: *NOTPME: a ^{31}P NMR probe for measurement of divalent cations in biological system*. Lett. Org. Chem. **1**, 194–200 (2004).
39. Bazakas, K.; Lukeš, I.: *Synthesis and Complexing Properties of Polyazamacrocycles with Pendant N-Methylenephosphinic Acid*. J. Chem. Soc. Dalton Trans, 1133–1137 (1995).